

CONSÓRCIO SETENTRIONAL DE EDUCAÇÃO A DISTÂNCIA DE
BRASÍLIA E UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOÍAS

Curso de Licenciatura em Biologia a Distância

Rosiene Ferreira Campos

***IDENTIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS BACTERIANAS ENCONTRADAS EM
BEBEDOUROS ESCOLARES***

Brasília
2012

Rosiene Ferreira Campos

***IDENTIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS BACTERIANAS ENCONTRADAS EM
BEBEDOUROS ESCOLARES***

Artigo apresentado, como exigência parcial para a obtenção do grau de Licenciatura em Biologia, na Universidade de Brasília, sob a orientação da Prof. Ms, Karina Cunha dos Santos.

Brasília
2012

Rosiene Ferreira Campos

***IDENTIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS BACTERIANAS ENCONTRADAS EM
BEBEDOUROS ESCOLARES***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Biologia da Universidade de Brasília.

Aprovado em 25 de agosto de 2012.

Prof. Ms, Karina Cunha dos Santos
Universidade de Brasília
Orientadora

Prof. Ms, Diana Paola Gómes Mendoza
Universidade de Brasília
Avaliador(a)

Prof. Ms, Elaine Nascimento Aquino
Universidade de Brasília
Avaliador(a)

Prof. Ms, Anne Caroline Dias Neves
Universidade de Brasília
Coordenador do Curso de Licenciatura em Biologia

Brasília
2012

Este trabalho é dedicado a Deus, aos meus queridos pais,
aos meus irmãos (Rosemberg *in memoriam*), a minha afilhada Yasmim,
a minha orientadora Karina, a Elaine pelo apoio inicial e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e da sabedoria.

Aos pais, por seu amor, carinho e paciência nos meus dias de aflição.

Aos irmãos (Rosemberg *in memoriam*) pela confiança, pelo apoio, pelo carinho e paciência.

Aos professores, pelo conhecimento e dedicação.

A minha orientadora, Karina por todas as correções e pela dedicação ao nosso trabalho.

A Elaine, por toda a ajuda inicial e apoio que me ofereceu.

Ao Wagner Fontes pela iniciativa de fazer que esse curso se realizasse e por todo o apoio oferecido.

A Anne pela excelente coordenação.

A minha amiga Ludmilla e ao amigo Alexandre pelo incentivo inicial para realização do curso.

Ao amigo Moacir por seu companheirismo e dedicação.

Ao senhor Jorge por ter autorizado a realização da pesquisa no Laboratório Regional da Ceilândia SES/DF.

A Jacyara e ao Robson que com muito carinho e dedicação me orientaram nas práticas realizadas no Laboratório de Microbiologia do LRC SES/DF.

A diretora Valéria pela autorização da realização da pesquisa na Escola Municipal Franklin Graham.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram, para a realização deste trabalho.

RESUMO

CAMPOS, Rosiene Ferreira. 25/08/2012. 38 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (licenciatura em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, UnB, Brasília, 2012

A correta higienização de banheiros e bebedouros escolares não ocorre na maioria das escolas públicas brasileiras, onde faltam materiais e funcionários para a limpeza periódica desses ambientes. Além disso, na maioria deles, não são disponibilizados aos alunos sabonetes e álcool gel para higiene correta das mãos. Diante desta realidade, o presente estudo investigou a presença de bactérias em maçanetas da porta dos banheiros e nas torneiras de bebedouros da Escola Municipal Franklin Graham em Formosa-GO. O estudo também classificou as colônias obtidas e cultivou em novos meios para analisar a relação entre bactérias das torneiras e sua possível contaminação serem provenientes de banheiros próximos. Foram identificadas bactérias do gênero *Staphylococcus* e das espécies *Pseudomonas luteola* e *Tatumella ptyseos* o que indica bactérias da microbiota normal, saprófitas e presentes em resíduos de expectoração que podem trazer problemas ao alcançar a corrente sanguínea, levando a graves infecções. A partir desse estudo, espera-se que seja desenvolvido um projeto de educação e higiene no ambiente escolar, a fim de evitar a proliferação de doenças entre alunos e funcionários.

Palavras-chave: antibiograma, bactérias, bebedouros, colônias, escola, maçanetas, torneiras.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Parede bacteriana Gram-positiva e Gram-negativa.	16
Figura 2: Fluxograma geral dos procedimentos realizados.	22
Figura 3: A Prova da catalase; B Resultados das amostras Gram-positivas.....	26
Figura 4: Torneiras do bebedouro dos alunos.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Testes para identificação de espécies bacterianas Gram-negativas	18
Tabela 2 – Testes para identificação de espécies bacterianas Gram-positivas	20
Tabela 3 – Identificação das placas e aspecto macroscópico das culturas	25
Tabela 4 – Resultado da identificação pelo sistema Walk Away®	28
Tabela 5 – Perfil de sensibilidade das espécies analisadas.....	32

LISTA DE SIGLAS

ACE	Acetamida
ADO	Adonitol
ARA	Arabinose
ARG	Arginina
BAC	Bacitracina
BE	Bile esculina
BL	Beta- lactamase
CET	Cetrimida
CIT	Citrato
Cl ₈	Colistina
CV	Violeta de Cristal
Da	Dalton ou massa atômica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Fd ₆₄	NitroFurantoína
GLU	Glicose
HEM	Hemólise
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
IDX	Indoxil-fosfatase
IND	Indol
INO	Inositol
INU	Inulina
KOH	Hidróxido de Potássio
K ₄	Kanamicina
LAC	Lactose
LRC	Laboratório Regional da Ceilândia
MAN	Manitol
MAL	Malonato
MEL	Melibiose
MNS	Manose
MS	Despiste de Micrococos
NACL	Cloreto de Sódio (NaCl) 5%
NIT	Nitrato
NOV	Novobiocina
OF/G	Oxidação-fermentação
ONPG	Galactosidase
OPT	Optoquina
PGR, PGT	Glicosidases
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHO	Fosfatase
PRV	Piruvato
PYR	Pirrolidonil-beta-naftilamida
P ₄	Penicilina

RAF	Rafinose
RHA	Ramnosên
RBS	Ribose
SES/DF	Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal
SOR	Sorbitol
SUC	Sucrose
TAR	Tartarato
TRE	Trealose
To ₄	Tobracina
URE	Uréia
TDA	Triptofan Deaminase
VP	Voges-Proskauer

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE SIGLAS.....	ix
1. Introdução.....	12
2. Objetivo Geral	13
2.1. Objetivos específicos	13
3. Fundamentação Teórica	14
4. Metodologia	21
4.1. Coleta de amostras	22
4.2. Crescimento bacteriano.....	23
4.3. Isolamento das colônias e coloração.....	23
4.4. Prova da catalase.....	23
4.5. Identificação e sensibilidade	24
5. Resultados e Discussão.....	24
5.1. Aspectos macroscópicos das colônias	24
5.2. Coloração de Gram	25
5.3. Prova da Catalase.....	25
5.4. Identificação de espécies de bactérias Gram-negativas	27
5.5. Resultado do perfil de sensibilidade das bactérias Gram-negativas das placas 1, 2 e 7	31
5. Considerações finais.....	35
6. Referências Bibliográficas	36

1. Introdução

As bactérias estão presentes nos mais variados ambientes e seres vivos do planeta Terra. Sua importância ecológica e econômica é grande, pois muitas delas participam da produção de oxigênio pelo processo de fotossíntese; absorção de substâncias pelas plantas; decomposição de resíduos industriais, agrícolas; controles biológicos; biorremediação; processos de fermentação industriais; engenharia genética; decomposição de organismos mortos; ciclos de elementos químicos (oxigênio, nitrogênio, carbono, fósforo, enxofre); para a biotecnologia; entre outras formas de aplicação (BURTON; ENGELKIRK, 2005).

Existem, entretanto, bactérias patogênicas para o homem, que geram as mais variadas doenças. Isso é favorecido pelo fato de ambientes públicos nem sempre possuírem uma adequada higienização, e infelizmente, em função da tubulação de água, a maioria dos bebedouros são instalados nas proximidades dos banheiros.

Devido à incorreta limpeza das mãos por parte dos alunos e funcionários e a demora na limpeza das maçanetas e torneiras dos bebedouros (que na maioria das vezes não são higienizados), ocorre à contaminação por bactérias patogênicas nesses ambientes, e posteriormente, elas podem contaminar o indivíduo no momento da alimentação (via oral), ou no contato da mão com a boca por outros motivos, bem como no contato com o nariz e os olhos.

A coloração de Gram marca o início do reconhecimento do tipo de parede celular da bactéria, que pode ser complementada por outros testes como a catalase, coagulase, oxidase e provas bioquímicas que conduzem a identificação de gêneros e ou espécies bacterianas. O antibiograma ajuda ainda na escolha do antibiótico correto para o tratamento de patologias e na verificação de possíveis mutações dentro de uma mesma espécie. Uma identificação preliminar consiste na observação macroscópica das colônias em Ágar sangue que podem ser sugestivas de Gram-positivas ou Gram-negativas, além dos tipos de hemólise. (AGUIAR, 2008).

A correta identificação de espécies ou pelo menos de gêneros bacterianos colabora no diagnóstico das possíveis doenças causadas pela presença de bactérias patogênicas. Assim, se torna possível identificar as espécies ou os gêneros presentes nos bebedouros da escola e a partir dos resultados desenvolver projetos de conscientização a respeito da importância de uma correta higiene no âmbito escolar.

O presente estudo tem por finalidade identificar e classificar as colônias bacterianas presentes nos bebedouros escolares e verificar se há uma relação entre a má higienização das mãos com o transporte desses microorganismos aos bebedouros usados pelos alunos e funcionários da escola e conseqüentemente, sua penetração no organismo humano.

Frente ao avanço da Gripe A que ocorreu no ano de 2010, houve uma grande divulgação das formas corretas de se higienizar e evitar a contaminação com o vírus nos mais variados ambientes. Entretanto, passado o surto, não foi desenvolvido nenhum outro tipo de trabalho de conscientização.

Com exceção desse período de preocupação com a Gripe A, em nenhum outro momento houve campanhas para educar as pessoas quanto ao correto uso dos sanitários e dos bebedouros públicos. Assim, necessita-se de estudos que reforcem e comprovem a contaminação nesses ambientes, com o intuito de conscientizar a população novamente sobre medidas de segurança e higiene pessoal, bem como higiene coletiva. Portanto, o presente estudo além de ser viável economicamente, é de grande importância social. Isso porque o simples fato de lavar as mãos evitaria um grande número de pessoas nas filas dos postos de saúde e hospitais, necessitando de atendimento devido à contaminação por microorganismos e vírus.

2. Objetivo geral

Identificar as principais bactérias presentes nos banheiros e bebedouros escolares, bem como verificar a possibilidade de veiculação de um local para o outro.

2.1. Objetivos Específicos

- Detectar a presença de bactérias em maçanetas de banheiros e classificá-las quanto ao formato de suas colônias e tipo de parede celular;
- Analisar quantitativamente as colônias formadas e realizar teste de Gram para constatar se são Gram-positivas ou Gram-negativas;
- Realizar testes bioquímicos específicos para o isolamento e identificação das espécies encontradas;
- Realizar antibiograma das bactérias isoladas a fim de se obter seu perfil de sensibilidade frente a vários antibióticos;

- Verificar se houve transporte bacteriano das maçanetas para as torneiras dos bebedouros e correlacioná-los com as condições de higienização do ambiente escolar.

3. Fundamentação teórica

As bactérias foram descobertas no século XVII (1674) por Anton van Leeuwenhoek (MURRAY et.al., 2004), entretanto, o nome bactéria é atribuído a um biólogo alemão Christian Gottfried Ehrenberg no ano de 1838 com o significado de pequeno bastão (CRUZ, 2011).

As bactérias podem ser classificadas de acordo com os seguintes critérios: fenótipo, avaliação analítica e genótipo (MURRAY et.al., 2004).

São classificadas quanto à forma de seus organismos (morfologia) em: cocos, bacilos, bastonete curvo, forma espiralada e pleomórficas (capacidade de existir em várias formas). Também podem ser observados os aspectos macroscópicos das colônias como propriedades hemolíticas em ágar-sangue, tamanho e formas assumidas pela colônia (diplococos, estreptococos, estafilococos, téttrade, tipo sarcina, diplobacilos, estreptobacilos) (BURTON; ENGELKIRK, 2004).

De acordo com Luz Neto et. al. (2008) as características morfológicas das células bacterianas seriam: cocos são bactérias arredondadas; vibriões são bactérias com formato de vírgula; bacilos em forma de bastões e espirilos em forma de espirais. Os cocos recebem denominações de acordo com os agrupamentos de suas colônias que podem ser: diplococos - de dois em dois cocos; estafilococos – em forma de cacho de uva; e estreptococos - em cadeia.

Segundo Burton e Engelkirk (2005) há também os arranjos téttrade que são grupos de 4 cocos e o tipo sarcina que agrupa 8 cocos. Eles apresentam apenas três formas básicas de bactérias, sendo que os bacilos assumiriam formas curvas (correspondente aos vibriões) ou de espiral (correspondente ao espirilo). Deixam claro que nem todas as bactérias recebem o nome característico de sua forma como é o caso da *Neisseria* spp (coco) e da *Escherichia coli* (bacilos). Caracterizam bem outros grupamentos de bactérias formados por bacilos que podem ser: diplobacilos de dois em dois; estreptobacilos em cadeias e, ainda bacilos que podem ser encontrados empilhados uns sobre os outros assumindo um arranjo em paliçada. Os bacilos com aparência parecida a estes últimos recebem a denominação de difterióides. Um formato pouco comentado é o cocobacilo que seria um bastonete mais curto, como é o caso da *Acinetobacter* spp. Bactérias espiraladas aparecem geralmente em forma isolada, mas em alguns casos podem

formar pares. A morfologia asa de gaivota é formada por um par de bacilos curvos. Existem ainda, bactérias que perdem sua forma característica devido a fatores que impedem a formação de paredes celulares com aspecto normal. Algumas recebem a denominação formas L. As pertencentes ao gênero *Mycoplasma* não apresentam parede celular e por isso apresentam várias formas ao serem observadas ao microscópio e por essa característica são chamadas pleomórficas.

Estudar as formas assumidas pelas células bacterianas ajudam no reconhecimento de algumas doenças, como é o caso da *Listeria monocytogenes* causadora da meningite neonatal ou mesmo da *Streptococcus pyogenes* que causa a faringite estreptocócica (BURTON; ENGELKIRK, 2005).

A classificação fenotípica pode ser feita de acordo com a capacidade que as bactérias possuem de absorver a *coloração de Gram*, sendo assim divididas em: Gram-positivas e Gram-negativas.

As Gram-positivas são aquelas que possuem parede celular composta por um grande número de camadas principalmente de peptidoglicano exterior a membrana celular, sendo em sua maioria ligadas ao ácido teicóico por ligação covalente, como pode ser observado na figura 1 (HARVEY; CHAMPE; FISCHER, 2008). O ácido lipoteicóico também pode estar “ancorado” na membrana citoplasmática, que pode ainda apresentar polissacarídeos complexos e se associar a proteínas M (de estreptococos) ou R (de estafilococos) (MURRAY et.al., 2004).

Já as bactérias Gram-negativas, possuem membrana interna e externa, sendo a camada peptidoglicana encontrada no espaço entre elas. Essa região recebe o nome de espaço periplasmático (HARVEY; CHAMPE; FISCHER, 2008). Nesse espaço encontramos várias enzimas hidrolíticas como: “proteases, fosfatases, lipases, nucleases e enzimas que degradam carboidratos”. A membrana externa é formada por dois folhetos: o interno que contém fosfolipídeos e o externo que tem em sua composição principalmente lipopolissacarídeos, que são endotoxinas que estimulam respostas imunológicas. Assim, o lipopolissacarídeo pode ocasionar febre e choque, bem como a reação de *Shwartzman* que leva a uma coagulação intravascular disseminada após o aumento da quantidade de endotoxinas na corrente sanguínea. Também são encontradas “altas concentrações” de proteínas nas membranas externas, que podem funcionar como proteínas transmembrana (que atravessam bicamada lipídica totalmente) podendo haver um grupo de porinas “que permitem a difusão através da membrana de moléculas menores que 700 Da” (MURRAY et.al., 2004). Alguns desses aspectos podem ser observados na figura 1.

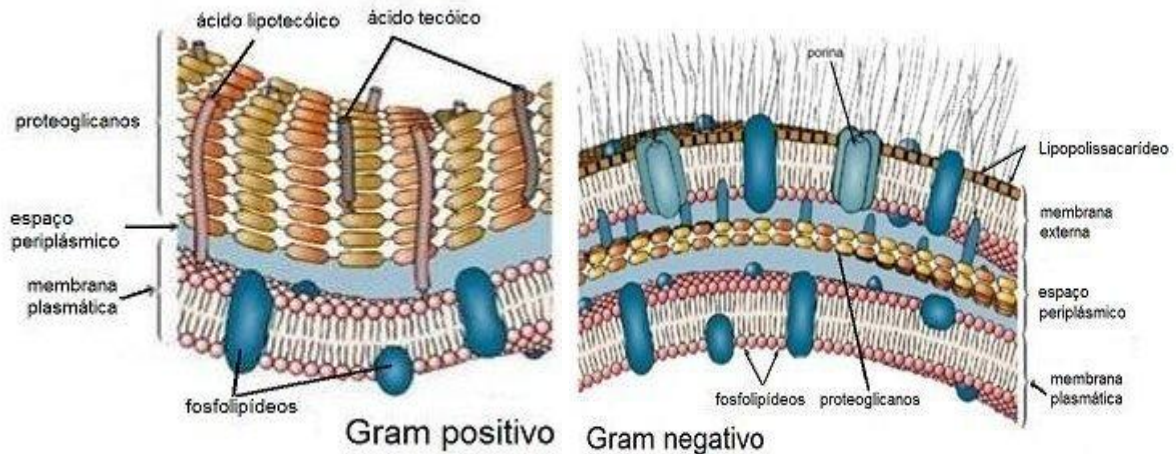


Figura 1: Parede bacteriana Gram-positiva e Gram-negativa (ARAÚJO, 2010).

O doutor Hans Christian Gram, médico dinamarquês, foi o responsável pela criação da coloração de Gram, no ano de 1884. De acordo com Burton e Engelkirk (2005) sua técnica permitia diagnosticar se as bactérias encontradas no tecido pulmonar dos pacientes que faleceram de pneumonia eram Gram-positivas (tingiam-se de azul) ou Gram-negativas (tingiam-se de vermelho). Seu mecanismo foi explicado por Salton no ano de 1963. O método consiste basicamente em secar e aquecer as bactérias na lâmina, e cobri-las com Cristal violeta, que lhes conferem uma coloração roxa. Em seguida a lâmina é lavada e coberta com iodo de *Gram* o que confere a bactéria uma cor azul. Quando a lâmina é lavada com algum agente descorante como o álcool etílico 95% ou acetona, as Gram-negativas perdem o complexo cristal-violeta-iodo e as Gram-positivas retém. Em seguida a lâmina é coberta por safranina (corante vermelho), que é absorvido pelas bactérias gram-negativas. As gram-positivas continuam coradas com o complexo violeta-iodo.

É válido salientar que a maioria das Gram-positivas são reativas às penicilinas, enquanto as Gram-negativas podem ser eliminadas por outras classes de antibióticos além das penicilinas (ALCAMO; ELSON, 2004). Algumas bactérias Gram-positivas têm apresentado resistência à penicilina, como é o caso da espécie *Streptococcus pneumoniae* e isso tem deixado a comunidade científica em preocupação. A resistência tem apresentado um percentual entre 3% e 13%, mas há países em que já apresentam uma resistência bacteriana de 40% (MIMICA; MENDES; MIMICA, 2005).

A classificação analítica envolve a identificação das substâncias encontradas nas células bacterianas podendo ser: ácidos micólicos, lipídios totais da célula, proteínas totais e

enzimas celulares (eletroforese multilocus enzimática). Essa classificação ajuda na identificação do gênero, espécie ou subespécie e em alguns casos, investigações epidemiológicas (MURRAY et.al., 2004).

A classificação genética foi feita primeiramente pela relação guanina-citosina. Depois passou a se usar a hibridização do DNA a fim de detectar se dois organismos seriam da mesma espécie. E agora, por meio da extração do DNA, é possível identificar o organismo em sondas moleculares espécie-específicas. A análise da sequência de ácidos nucleicos utiliza sondas para encontrar sequências específicas de ácidos nucleicos que são próprios de cada gênero, espécie ou subespécie, sendo sua principal análise o DNA ribossomal. Também são usados os métodos de “análise de plasmídeo, ribotipagem e análise de fragmentos de DNA cromossomal” (MURRAY et.al., 2004).

A identificação preliminar de colônias de bactérias pode ser feita através das características que elas apresentam em meios específicos. Assim, por meio da observação de formação de alfa, beta ou gama hemólise, cremosidade, cor, tamanho, formato, mucosidade, é possível sugerir o gênero bacteriano, sendo necessárias outras provas para confirmação da espécie, como: catalase, coagulase, bacitracina, oxidase, urease, fenilalanina e painéis com testes bioquímicos que são específicos para Gram-positivos e Gram-negativos (AGUIAR, 2008).

Um dos meios mais utilizados em laboratório é o Ágar sangue de carneiro, pois é um meio que permite o crescimento de um grande número de microorganismos. De acordo com as características observadas conforme descrito anteriormente é possível isolar essas bactérias ressemeando-as em meios específicos. Um exemplo de isolamento é o Ágar Mac Conkey que é utilizado para bacilos Gram-negativos (LEVY, 2004).

Atualmente a identificação de bactérias pode ser feita por equipamentos específicos que são automatizados. Nacionalmente são conhecidos o Walk Away® e o VITEK®. A vantagem desses equipamentos é que eles identificam a espécie bacteriana e também sua sensibilidade ou resistência a antibióticos. O Walk Away®, por exemplo, identifica espécies por meio de testes químicos e bioquímicos e realiza o antibiograma automatizado. Esses testes são feitos em painéis para bactérias Gram-positivas ou para Gram-negativas, e isso se deve ao fato dos reagentes e antibióticos utilizados para cada uma delas serem específicos (AGUIAR, 2008).

Os principais testes realizados para a identificação de espécies bacterianas Gram-negativas são os enumerados na tabela 1.

Tabela 1 – Testes para identificação de espécies bacterianas Gram-negativas

Teste realizado	Descrição do teste
Fermentadoras de carboidratos (GLU), Sucrose (SUC), Rafinose (RAF), Ramnosen (RHA), Arabinose (ARA), Inositol (INO), Adonitol (ADO), Melibiose (MEL).	O resultado positivo é possível pela mudança de coloração para amarelo. Isso ocorre porque há uma queda de pH que é identificada pelo indicador vermelho de Fenol.
Uréia (URE)	Uma vez que haja a enzima urease, a uréia (URE) é quebrada formando amoníaco. Este por sua vez eleva o pH o que pode ser detectado pelo indicador vermelho de Fenol que produz uma coloração vermelha em meio básico.
Sulfeto de hidrogênio (H ₂ S)	O Sulfeto de hidrogênio (H ₂ S) reage com íons de ferro para produzir um precipitado preto. Esse composto (H ₂ S) é formado a partir do tiosulfato de sódio.
Indol (IND)	Obtido a partir do metabolismo do triptofano. Este por sua vez pode ser detectado pela adição de reagente de Kovac, que em presença de indol, adquire coloração vermelha.
Lisina, Arginina, Ornitina (LYS, ARG, ORN)	A descarboxilação dos aminoácidos Lisina (LYS), Arginina (ARG) e Ornitina (ORN) tem como resultado a formação de aminas básicas que podem ser verificadas pela adição do indicador ácido-base púrpura de bromocresol.
Triptofan Deaminase (TDA)	Algumas bactérias conseguem desaminar o Triptofano e formar o ácido indolepirúvico. Este reage com o citrato férrico amoniacal que está no meio devido à adição do cloreto de ferro produzindo uma cor marrom (castanha).
Hidrólise de esculina (ESC)	Pode ser detectada pela presença de citrato de amônia no meio que ao reagir com os produtos hidrolíticos formam um precipitado preto.

Voges-Proskauer (VP)	Ocorre pela produção de acetoina a partir do piruvato de sódio e sua detecção se dá pela adição de Hidróxido de Potássio (KOH) a 40% e de Alfa-Naftol a 5% que forma uma cor vermelha.
Galactosidase (ONPG)	A presença da enzima (β -galactosidase) hidroliza o ortonitrofenil- β -D-galactopiranosídeo que ao liberar o orto-nitrofenol que apresenta a cor amarela.
Citrato (CIT), Malonato (MAL), Acetamida (ACE) e o Tartarato (TAR)	São utilizados como única fonte de carbono e induzem a elevação do pH tornando-o básico o que pode ser detectado pela coloração azul adquirida pelo indicador ácido-base azul de bromotímol.
Oxidação-fermentação (OF/G)	Quando a glicose é oxidada ela forma ácido o que leva a diminuição do pH o que pode ser diagnosticado pela aquisição da cor amarela do indicador azul de bromotímol. A avaliação da fermentação da glicose é feita da mesma maneira, porém adicionando-se óleo mineral ao pocinho, que gera condições anaeróbicas, e sua leitura é feita do mesmo modo que da oxidação (formação de coloração amarela).
Nitrato (NIT)	Verifica a capacidade de redução do nitrato a nitrito pela bactéria. Essa redução é verificada pela adição de Ácido Sulfanílico seguida pela N,N-Dimetil-alfa-naftilamina que em presença de nitrito apresentam a coloração vermelha.
Cetrimida (CET)	É realizada a avaliação do crescimento bacteriano em caldo de Mueller-Hinton suplementado com cetrimide, verificando se há tolerância.
Penicilina (P ₄), Kanamicina (K ₄), Colistina (Cl ₈), NitroFurantoína (Fd ₆₄), Tobracina (To ₄)	São antimicrobianos que participam da identificação de bactérias. É verificada a resistência pelo crescimento ou não de bactérias em concentrações específicas desses antimicrobianos.

(AGUIAR, 2008).

Os testes realizados para a identificação de espécies bacterianas Gram-positivas são descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Testes para identificação de espécies bacterianas Gram-positivas

Teste realizado	Descrição do teste
Violeta de Cristal (CV)	O crescimento de bactérias distingue estreptococos (positivo) de estafilococos (essencialmente negativo).
Despiste de Micrococos (MS)	Distingue o crescimento de estafilococos (resistentes) de micrococos (sensíveis) em presença de baixa concentração de bacitracina (0,04µg/ml).
Nitrato (NIT)	A redução de nitrato a nitrito (cor vermelha) indica estafilococos o resultado negativo indica estreptococos
Novobiocina (NOV)	A resistência a novobiocina indica algumas espécies de estafilococos como <i>S. xylosus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. cohnii</i> e <i>S. sciuri</i> .
Glicosidases (PGR, PGT)	A capacidade de um organismo produzir enzima glicosidase é detectada pela formação de produto de cor amarela.
Indoxil-fosfatase (IDX)	A capacidade de um organismo produzir essa enzima é detectada pela formação de produto cor azul. Os estafilococos que tem essa enzima são positivos para coagulase e DNase.
Voges-Proskauer (VP)	A reação positiva forma produto de cor vermelha.
Optoquina (OPT)	O <i>Streptococcus pneumoniae</i> é sensível optoquina, os demais cocos Gram-positivos são inibidos por ela.
Fosfatase (PHO)	O produto da reação positiva apresenta coloração amarela.
Bile esculina (BE)	A formação de um precipitado negro indica a reação positiva.
Pirrolidonil-beta-naftilamida (PYR)	A reação positiva produz um produto cor vermelha, pois em presença da enzima pirrolidonase ocorre uma reação com a adição do reagente peptidase que produz essa coloração.
Arginina (ARG)	A reação positiva leva a desidrolização do aminoácido deixando o meio alcalino produzindo uma coloração vermelha em presença do indicador vermelho de fenol.
Uréia (URE)	A formação de amônia leva a um aumento de pH pode ser detectada pela cor vermelha detectada pelo indicador vermelho.

	de fenol
Carboidratos Rafinose (RAF), Lactose (LAC), Trealose (TRE), Manose (MNS), Sorbitol (SOR), Arabinose (ARA), Ribose (RBS), Inulina (INU), Manitol (MAN)	A fermentação desses carboidratos forma ácidos que podem ser detectados pelo indicador vermelho de fenol que adquire coloração amarela.
NaCl 5% (NACL)	A tolerância a esse sal diferencia enterococos de não enterococos e também é característico de estafilococos.
Bacitracina (BAC)	A sensibilidade a bacitracina em baixas concentrações é indicada pela ausência de crescimento. A <i>Streptococcus pyogenes</i> é sensível a bacitracina em concentrações baixas.
Piruvato (PRV)	Ao se utilizar o piruvato formam-se ácidos que podem ser detectados pelo indicador vermelho de fenol que adquire cor amarela.
Beta- lactamase (BL)	Tem sua presença demonstrada pela adição de Penicilina e iodo ao poço BL. Se houver a enzima o produto da reação fica incolor. Se não houver o produto apresenta coloração preta.
Hemólise (HEM)	Havendo estreptolisinas S e O, que são produzidas por estreptococos ocorre lise completa ou parcial de glóbulos vermelhos em placa de gelose que contenha sangue de ovelha.

(AGUIAR, 2008).

4. Metodologia

A pesquisa ocorreu na Escola Municipal Franklin Graham, no município de Formosa-GO. Foi realizada a coleta de amostras nas maçanetas internas dos banheiros de alunos: feminino e masculino e do banheiro dos professores, bem como das torneiras dos bebedouros dos alunos e dos professores. Em seguida, essas amostras foram encaminhadas para o Laboratório Regional da Ceilândia SES/DF. No laboratório foi feito o semeio em Ágar sangue de Carneiro. Após um dia

de incubação foi verificada a presença de microorganismos que foram semeados em Ágar chocolate e iniciado o processo de identificação preliminar de alguns tipos de colônias e em seguida, foi feita a coloração de Gram em todas as colônias detectadas. Então foram realizadas as provas da catalase e colocação em aparelho automatizado para identificação, conforme mostra o fluxograma apresentado na figura 2.

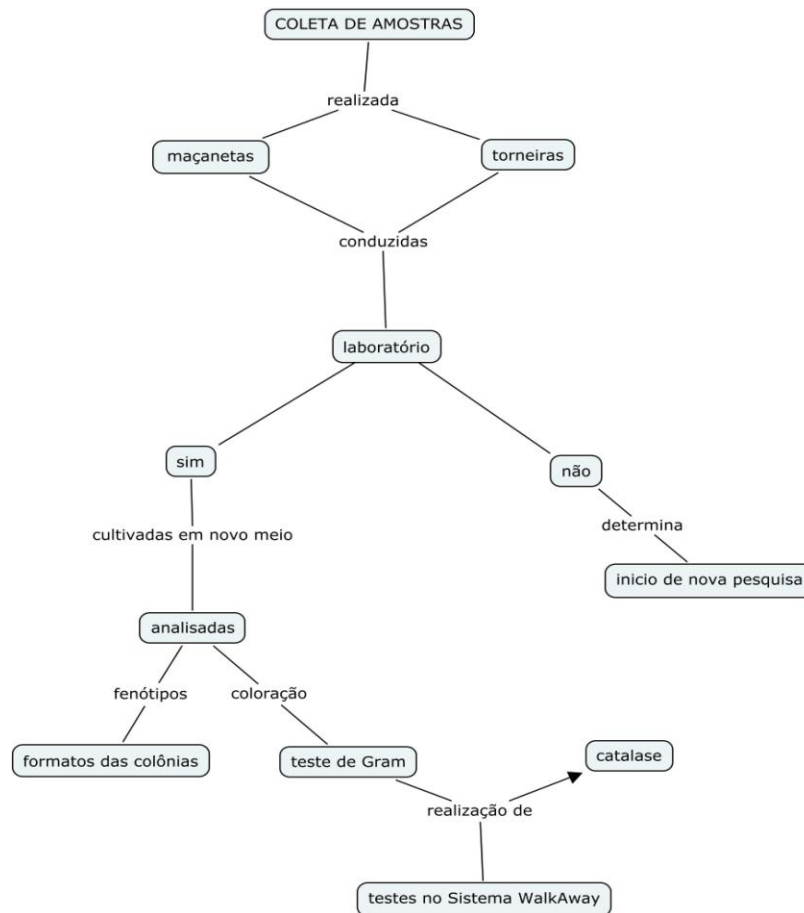


Figura 2: Fluxograma geral dos procedimentos realizados

4.1. Coleta de amostras

A coleta de amostras foi realizada na Escola Municipal Franklin Graham que pertence à rede pública da cidade de Formosa –GO. Foi utilizado um *Swab* para cada local, que imediatamente após a coleta foi mergulhado no meio de transporte de Stuart. Cada *Swab* foi friccionado sobre a superfície de cada uma das maçanetas internas dos banheiros e sobre a superfície de cada uma das torneiras dos bebedouros.

O meio de Stuart é um meio nutriente inespecífico, que serve para conservar as características do material durante o transporte, por até 48 horas.

O procedimento foi realizado da seguinte maneira: Os alunos e os professores utilizaram normalmente o banheiro e os bebedouros e após o período de uma hora e cinquenta minutos (da entrada dos alunos até alguns minutos após o intervalo), foi feita a coleta das amostras.

Temos três banheiros e dois bebedouros envolvidos na pesquisa:

- Banheiro da sala dos professores e seu respectivo bebedouro;
- Banheiro dos alunos: feminino e masculino e seu respectivo bebedouro;

4.2. Crescimento bacteriano

Cada amostra foi semeada em meio de cultura Ágar sangue e incubadas por 24 horas a 37°C.

Após o crescimento bacteriano foi feita uma avaliação do tipo de colônia que predomina em diferentes banheiros e bebedouros e fez-se a correlação de colônias entre banheiros e bebedouros mais próximos.

4.3. Isolamento das colônias e coloração

Realizou-se o isolamento das colônias de interesse semeando em Ágar chocolate para crescimento e confirmação de morfologia e distinção de Gram-positiva e Gram-negativa, utilizando a coloração de Gram.

4.4. Prova da catalase

Depois de diagnosticada a presença de Gram-positivas sugestivas de estafilococos, foi feita a prova da catalase para confirmar a impressão macroscópica das colônias.

A catalase é uma enzima que decompõe peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e gás oxigênio (O_2). Esse teste é utilizado para os seguintes gêneros bacterianos:

Staphylococcus, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Moraxella catarrhalis*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Listeria* (LEVY, 2004).

4.5. Identificação e sensibilidade

Realizaram-se testes de identificação e sensibilidade a antimicrobianos das espécies de maior relevância e sugestivas de coliformes fecais.

Os testes foram feitos pelo sistema Walk Away® que realiza simultaneamente testes de identificação e sensibilidade. Para o teste há painéis de identificação desidratados específicos para Gram-negativos e Gram-positivos. Esses painéis são inoculados com solução (específica) contendo colônias bacterianas, devendo-se adicionar óleo mineral nos poços sublinhados. Estes painéis contêm as principais provas bioquímicas de identificação com base na fermentação de carboidratos, resistência a antibióticos, reações de redução, oxidação e outros (AGUIAR, 2008).

O equipamento também faz o antibiograma que consiste em realização de prova de sensibilidade dos microrganismos a antibióticos, sendo utilizado para alguns grupos de bactérias que facilmente adquirem resistência (RIBEIRO, 2005). É realizada a Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e para isso, são utilizados painéis específicos, onde ocorrem microdiluições do inóculo a concentrações crescentes de antimicrobianos, feito isso Walk Away® 96 ou AutoScan realiza leitura automática. Assim os microrganismos podem ser classificados da seguinte forma: S = Sensível: cepa infecciosa pode ser tratada com o antimicrobiano em dosagem adequada a infecção ou espécie infecciosa; I = Intermediário: o microrganismo pode ser inibido através de concentrações maiores de certas drogas; R = Resistente: a cepa não é inibida pela concentração usual da droga; MS = Moderadamente sensível; NA = Não aplicável, ou seja, não é indicado para o microrganismo que foi isolado; BLAC = Beta-lactamase positiva; IB = Beta-lactamase induzível, ou seja, pode produzir beta-lactamases e se tornar Resistente; ESBL = Beta-lactamase espectro-induzida (VALLS, 2012).

5. Resultados e Discussão

5.1. Aspectos macroscópicos das colônias

Após a coleta com Swab e o transporte do material em Ágar Stuart Gel, que foi conservado à temperatura ambiente, ele foi semeado em Ágar Sangue (de carneiro) e após a incubação de 24 horas, foram encontrados os resultados descritos na tabela 3.

Tabela 3: Identificação das placas e aspecto macroscópico das culturas

Número da placa	Identificação da placa	Aspecto macroscópico observado e análise de hemólise em Ágar Sangue das colônias
7	Maçaneta interna da porta do banheiro feminino.	25 colônias brancas, opacas, pequenas, cremosas, gama hemólise, sugestivas de Gram-positivas 1 colônia branca, achatada, cremosa, gama hemólise, sugestiva de Gram-negativa
3	Maçaneta interna da porta do banheiro masculino.	26 colônias brancas, opacas, pequenas, cremosas, gama hemólise, sugestivas de Gram-positivas.
1	Maçaneta interna da porta do banheiro dos professores.	38 colônias brancas, opacas, pequenas, cremosas, gama hemólise, sugestivas de Gram-positivas. 1 colônia translúcida, achatada, brilhante, gama hemólise, sugestiva de Gram-negativa.
2	Torneira do bebedouro de alunos 1	111 colônias, sendo a maioria: translúcidas, brilhantes, mucóides, gama hemólise, sugestivas de Gram-negativas.
4	Torneira do bebedouro de alunos 2	174 colônias, sendo a maioria: translúcidas, brilhantes, mucóides, gama hemólise, sugestivas de Gram-negativas.
5	Torneira natural do bebedouro de professores.	8 colônias brancas, opacas, pequenas, cremosas, gama hemólise, sugestivas de Gram-positivas. 4 colônias brancas, achatadas, cremosas, gama hemólise, sugestivas de Gram-negativas.
6	Torneira gelado do bebedouro de professores.	43 colônias brancas, opacas, pequenas, cremosas, gama hemólise, sugestivas de Gram-positivas. 1 colônia branca, achatada, cremosa, gama hemólise, sugestiva de Gram-negativa.

5.2. Coloração de Gram

Foi realizada a coloração de Gram para classificação bacteriana em Gram-positivas e negativas, o que coincidiu com o aspecto macroscópico observado nas placas de Ágar Sangue, conforme apresentado na tabela 3.

5.3. Prova de Catalase

O teste de catalase também foi realizado com as colônias gram-positivas, visualizadas em cachos, sugestivas do gênero *Staphylococcus*. Devido à formação imediata de bolhas, o resultado foi positivo, indicativo do gênero *Staphylococcus*. A ausência de bolhas ou efervescência indica resultado negativo, indicativo de *Streptococcus* e enterococos (HARVEY et.al., 2008).

O teste foi realizado com as colônias das placas 1, 3, 5, 6 e 7 e todos foram catalase positiva, indicando gênero *Staphylococcus*, conforme demonstrado na figura 3.

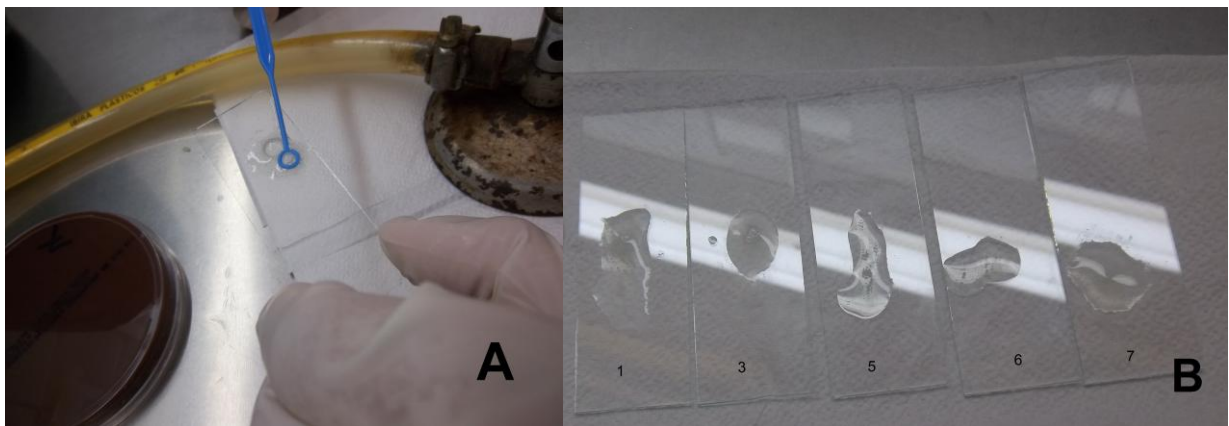


Figura 3: A Prova da catalase; B Resultados das amostras Gram-positivas (CAMPOS, 2012).

Os *Staphylococcus* podem ser agentes em processos infecciosos, sejam eles supurativos (furunculose, terçol, impetigo), ou generalizados (Caso atinja a corrente sanguínea), bem como das seguintes infecções: pulmonares, urinárias, em ossos longos, nos rins, feridas causadas por cirurgias e no tecido do coração que recebe o nome de miocárdico. Como infecções superficiais temos: a foliculite que provoca a inflamação do folículo piloso, quando esta ocorre no folículo dos cílios ela recebe o nome de terçol; a furunculose que ocasiona a inflamação do tecido celular subcutâneo e isso ocorre por meio da penetração bacteriana em folículos pilosos e glândulas sebáceas; antraz que gera o aparecimento de aglomerados de pequenos furúnculos na parte superior do pescoço bem como na região dorsal (LUZ NETO, 2008). De acordo com Burton E Engelkirk (2005), quase todas as infecções de folículos pilosos são provocadas por *Staphylococcus* da espécie *Staphylococcus aureus*. Caso essa espécie atinja a corrente sanguínea pode ocasionar: “pneumonia, abscessos pulmonares, osteomielite, sépsis, endocardite, meningite

ou abscessos cerebrais.” Segundo eles, a Cistite (inflamação da bexiga) pode ser causada por *Staphylococcus saprophyticus* e por *Staphylococcus epidermidis*.

De acordo com Trabulsi, Teixeira e Bueris (2005) o *Staphylococcus aureus* pode ser encontrados em várias partes do corpo como: pele, trato intestinal, fossas nasais e garganta, sendo sua incidência mais elevada em portadores nasais que trabalham em hospitais. A infecção por essa espécie pode ser exógena ou endógena e sua transmissão pode ser por contato direto ou indireto.

A espécie *Staphylococcus epidermidis*, de acordo com Bueris et al. (2005) faz parte da microbiota normal da pele e das mucosas humanas, e causam infecções em indivíduos que passaram por intervenções cirúrgicas ou por tratamentos em que se faz necessária a utilização de cateteres e implantes plásticos. Geralmente a contaminação ocorre no momento em que esses materiais são implantados seja por bactérias que se encontram na pele e mucosas do paciente, seja por parte do pessoal que faz o atendimento médico.

Há ainda *Staphylococcus saprophyticus* que também é da microbiota normal tanto da pele como das mucosas humanas. Ela é causadora de infecções urinárias em mulheres da faixa etária entre 20 e 50 anos de idade e também pode ocasionar o mesmo problema em homens a partir dos 50 anos. Elas podem ainda ser causadoras de infecção em diferentes órgãos e tecidos. São bactérias oportunistas (BUERIS et al., 2005).

5.4. Identificação de espécies de bactérias Gram-negativas

Foi realizada a identificação das espécies bacterianas Gram-negativas das placas 1, 2, 4 e 7. Por falta de painéis para Gram-negativos não foi feita a identificação das colônias encontradas na placas 5 e 6. Por se tratar de um laboratório público, há escassez de material e só foi possível a concessão de alguns painéis.

Essa identificação é feita por meio de equipamento automatizado do Sistema Walk Away® 96SI que realiza testes de identificação e de sensibilidade de modo simultâneo.

Os painéis utilizados para identificação dos bacilos foram de placas NC50 (B 1017-406 Lot/Exp 2012-05-05). Eles são específicos para bactérias Gram-negativas. São compostos por substratos de identificação e antibióticos que foram desidratados e que são reidratados por meio de um inoculador. Na ausência do Sistema Walk Away®, podem ser incubados e lidos

manualmente e posteriormente visualizados por um visualizador de microdiluição da MicroScan. Os resultados são registrados numa folha de cálculo do painel manual.

De acordo com AGUIAR (2008) é preciso que os testes levem a definição de um código com 8 dígitos para que esse número possa ser comparado com o banco de dados do fabricante levando a uma definição quase exata da espécie bacteriana (99,9%), conforme o verificado na tabela 4.

Tabela 4: Resultado da identificação pelo sistema Walk Away®

Número da placa	Local da amostragem	Espécie bacteriana encontrada
1	Maçaneta interna da porta do banheiro dos professores	<i>Pseudomonas luteola</i>
2	Torneira do bebedouro de alunos 1	<i>Tatumella ptyseos</i>
7	Maçaneta interna da porta do banheiro feminino.	<i>Tatumella ptyseos</i>

De acordo com Doublet, et al. (2010) a *Pseudomonas luteola* pode ser considerada um organismo saprófita ou mesmo comensal que raramente é capaz de ser patogênico aos seres humanos. Eles afirmam que há poucos registros de infecções clínicas em função do microorganismo (menos de 25 casos) sendo apresentadas as seguintes: “septicemia, meningite, peritonite, endocardite, úlcera e infecções, geralmente em associação com operações cirúrgicas ou a utilização de cateteres e próteses.” Assim, eles sugerem que a espécie pode tornar-se um frequente nosocomial patógeno, ou seja, um agente de infecção hospitalar. É interessante observar que a espécie anteriormente recebia a designação *Chryseomonas luteola*.

A *Tatumella ptyseos* consiste em um novo gênero e espécie sendo seu nome derivado a partir do nome de Harvey Tatum (microbiologista) tendo se adicionado a desinência diminutivo “ella”, para tornar o novo substantivo pertencente gênero feminino. A palavra *ptyseos* é um substantivo grego que significa “um cuspir”, ou seja, um resíduo de expectoração. Ela pertence à família das *Enterobacteriaceae* (HOLLIS et al., 1981). De acordo com Costa et al. (2008) a espécie raramente tem sido relatada como agente causador de doenças a humanos e há pouca informação na literatura médica a respeito dela. Dos poucos relatos existentes, afirma-se que ela é agente causador de infecções traqueobrônquicas/pulmonar, infecções com associação a tuberculose pulmonar e também infecção gastrointestinal. Até 2005, apenas cinco casos de

isolamento não foram de expectoração e sim de sangue. No Brasil ocorreram dois casos graves que levaram a septicemia, associadas com infecção do cateter e com celulite (COSTA, 2008).

Sabendo-se que as bactérias do gênero *Pseudomonas* podem ser encontradas: na água, no solo, em vegetação e em matéria orgânica em decomposição; e que são comuns ao ambiente hospitalar podendo-se encontrá-las em: esfregões, alimentos, reservatórios úmidos, equipamentos tanto de tratamento respiratório quanto de diálise, conseguindo sobreviver até mesmo no desinfetante e na água destilada, percebe-se a importância da correta higienização dos ambientes, bem como da pessoal. As bactérias desse gênero não são comuns a microbiota normal dos seres humanos, com exceção dos pacientes hospitalizados, ambulatoriais ou hospedeiros imunocomprometidos (MURRAY, et al., 2004).

Mesmo sendo uma bactéria raramente patogênica e que não pertence à microbiota normal de seres humanos, não se pode desprezar o fato de que a *Pseudomonas luteola* foi encontrada na maçaneta interna do banheiro dos professores e mesmo que a quantidade de colônias formadas seja pequena (apenas uma colônia), se ocorresse algum tipo de contato com a bactéria por meio de ferimentos profundos levando a sua entrada na corrente sanguínea, ela poderia levar a um quadro infeccioso, gerando resultados indesejáveis, e isso se agrava ao fato de muitas serem resistentes a antibióticos. É relevante mencionar que o banheiro dos professores até então era o único que tinha sabonete líquido e em barra para a lavagem das mãos.

Já a espécie *Tatumella ptyseos* apesar de ter sido mencionada por Trabulsi et al. (2005) como uma espécie não tradicional em infecções humanas, pertencente à Família *Enterobacteriaceae*, foi a espécie bacteriana Gram-negativa que apresentou um maior quantidade: mais de 100 colônias na torneira 1 do bebedouro dos alunos e 1 colônia na maçaneta interna do banheiro feminino. Sendo ela uma bactéria encontrada no escarro, daí a origem do nome *ptyseos*, sua veiculação pode ser não apenas das mãos dos alunos, como também, do retorno da água que entrou na boca e nariz dos alunos às torneiras e do contato das mãos com a boca e nariz no banheiro e posterior toque na maçaneta interna do banheiro. A primeira proposição fica clara com a análise da foto do bebedouro na figura 4. Sendo assim, um estudante que apresentar feridas na boca e estiver com baixa imunidade pode se contaminar por essa espécie bacteriana com facilidade, podendo levar a infecção grave dependendo do contato e da sua possível entrada na corrente sanguínea. Sendo pertencentes às *Enterobacteriaceae*, a

infecção por essa família bacteriana pode levar à septicemia (30 a 35% dos casos), infecções no trato urinário (70% dos casos) e muitas infecções intestinais (MURRAY, et al., 2004).



Figura 4: Torneiras do bebedouro dos alunos (CAMPOS, 2012).

Ainda de acordo com TRABULSI et al. (2005) as espécies bacterianas que pertencem a família das *Enterobacteriaceae* talvez sejam as mais importantes por pertencerem a ela muitos dos patógenos mais importantes tanto aos homens quanto aos animais. Ele afirma que bactérias dessa família estão entre os principais agentes de infecções em hospitais e intestinais em muitos países.

Foi encontrada a mesma espécie bacteriana *Tatumella ptyseos* na maçaneta interna do banheiro de alunos feminino e na torneira 1 do seu respectivo bebedouro. A quantidade de colônias formada a partir da amostra do banheiro feminino foi pequena (apenas uma colônia), entretanto, no bebedouro a quantidade foi grande: mais de 100 na torneira 1 e mais de 170 na torneira 2. Isso se deve ao fato de haver apenas um bebedouro para atender todos os alunos da escola o que torna maior a contaminação devido ao volume de pessoas manuseando e utilizando o mesmo bebedouro, o que é agravado pelo fato de não haver nenhum tipo de sabão ou detergente nos banheiros ou no lavatório externo, o que poderia reduzir a contaminação. Também foi feita a tentativa de identificação de amostra da placa 4 (torneira 2), mas por questões técnicas, não foi possível realizar a identificação. Pelo fato das características das colônias serem muito similares, pode se considerar a possibilidade das colônias também serem de *Tatumella ptyseos*. Além disso,

também foram detectadas colônias Gram-positivas nas placas 2 e 4, o que indica uma maior diversidade de colônias das amostras provenientes das duas torneiras dos bebedouros.

De acordo com Lima et al., (2007) a pele pode ser um reservatório de microorganismos e esses podem ser veiculados de uma superfície para outra através de contato pele com pele (direto), ou indireto (através do contato com objetos ou mesmo superfícies contaminadas). Afirmam ainda que os microorganismos podem pertencer:

- A microbiota residente: colonizadores das camadas mais internas da pele, sendo de baixa virulência “como estafilococos, corinebactérias e micrococos, pouco associados às infecções veiculadas pelas mãos” e difíceis de remover com água e sabão;
- Microbiota transitória: colonizadores das camadas mais superficiais da pele, sendo de fácil remoção pela lavagem com água e sabão e eliminados com solução antisséptica. Seus representantes são bactérias Gram-negativas como é o caso das *Enterobacteriaceae*, as bactérias não fermentadoras, como é o caso das *Pseudomonas*, bem como fungos e vírus.

Assim, foram identificadas bactérias da microbiota residente pertencentes ao gênero *Staphylococcus* e da microbiota transitória que podem ser eliminadas com o uso de água e sabão que é o caso da *Pseudomonas luteola* e da *Tatumella ptyseos*.

A higiene utilizando água e sabão deve ser feita no início do turno de estudo ou trabalho, antes de sair do banheiro, antes e depois das refeições, pelas pessoas que irão preparar os alimentos, podendo ser completada com a utilização de álcool 70% (que pode ou não estar na forma de álcool gel) e finalizada com o uso de antissépticos. Estes dois últimos são fundamentais em casos de surtos (LIMA et al., 2007). Infelizmente, isso não foi verificado na Escola Municipal Franklin Graham, e nem mesmo em muitas outras escolas municipais e estaduais, pois não há disponibilidade de sabão líquido, sabão em barra, sabonete ou mesmo detergente nos banheiros para os alunos lavarem as mãos e muito menos álcool gel para completar essa higienização. Pode-se considerar negligência por parte das autoridades competentes, uma vez que o ambiente fica propício não só à transmissão de doenças bacterianas, mas também fúngicas, virais e parasitárias, uma vez que a eliminação de microorganismos não é satisfatória.

5.5. Resultado do Perfil de sensibilidade das bactérias Gram-negativas das placas 1, 2 e 7

Tabela 5: Perfil de sensibilidade das espécies analisadas

Antibióticos	<i>Pseudomonas luteola</i> Placa 1	<i>Tatumella ptyseos</i> Placa 2	<i>Tatumella ptyseos</i> Placa 7
Amicacina	S	S	S
Amoxilina/K Clavulanato de <i>Enterobacteriaceae</i>	*	S	S
Ampicilina	*	I	S
Aztreonam	R	S	R
Cefazolina	*	S	S
Cefepime	S	S	S
Cefotaxima	R	S	S
Cefotaxima/K Clavulanato	*	*	*
Cefoxitina	*	S	S
Ceftazidima	S	S	S
Ceftazidima/ K Clavulanato	*	*	*
Ceftriaxona	I	S	S
Cefuroxima	*	S	S
Ciprofloxacina	S	S	S
Ertapenem	*	S	S
Gentamicina	S	S	S
Imipenem	S	S	S
Levofloxacina	S	S	S
Meropenem	S	S	S
Piperacilina/Tazobactam	S	S	S
Piperacilina	S	S	S
Tetraciclina	S	S	S
Ticarcilina/ K Clavulanato	R	S	S
Tobramicina	S	S	S
Trimetoprim/Sulfametoxazol	R	S	S

S = Sensível I = Intermediário R = Resistente

* = dados não disponíveis ou droga não recomendada ou testada

Conforme o observado na tabela 5, a espécie *Pseudomonas luteola* apresentou resistência a 4 antimicrobianos: Aztreonam, Cefotaxima, Ticarcilina/ K Clavulanato, Trimetoprim/Sulfametoxazol, sendo intermediária Ceftriaxona, Já a *Tatumella ptyseos* apresentou resistência apenas Aztreonam (placa 7) e foi intermediária a Ampicilina (placa 2).

De acordo com AGUIAR (2008) a resistência bacteriana pode ser natural (herdada e previsível) ou adquirida (devido à mudança genética não é previsível). Desta forma, os testes de sensibilidade foram desenvolvidos para avaliar essa resistência que não dá para ser prevista. Essa resistência adquirida pode ocorrer por mutação genética, pela aquisição de genes pelos mecanismos de transferência genética que podem ser conjugação (transferência por contato físico com transferência de plasmídeos) ou por transposição (por meio de transposons) ou mesmo a junção dos dois mecanismos, mutação e aquisição de genes.

Desta forma, podemos sugerir que a espécie *Tatumella ptyseos* encontrada nas placas 2 e 7 apresentou alterações genéticas, que influenciaram no perfil de sensibilidade, devido a diferenças na resistência a antimicrobianos.

Os mecanismos de resistência são vários, mas podemos destacar:

- a) Inibição enzimática, como no caso das beta-lactamases que degradam o anel beta-lactâmico das penicilinas e/ou das cefalosporinas ou ainda como no caso das enzimas que inativam os aminoglicosídeos.
- b) Alterações na permeabilidade de membrana externa como nas penicilinas que têm na parede celular dos bacilos gram negativos uma verdadeira barreira à sua penetração ao interior da célula; ou ainda como alterações da permeabilidade da membrana interna como os aminoglicosídeos em relação a algumas espécies de *Pseudomonas*; ou pela promoção de efluxo de certos antibióticos como no caso das tetracilinas em relação a algumas enterobactérias.
- c) Alterações nos alvos dos ribossomos, como para casos de resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas onde a alteração nos sítios de ligação de ribossomos pode levar ao surgimento de resistência à esses antimicrobianos.
- ci) Alterações nas enzimas alvo, como no caso de alterações nas PBPs (proteínas ligadoras de penicilinas) e que são, na verdade, enzimas que participam da formação da parede celular das bactérias gram positivas. Esse mecanismo de resistência ocorre, por exemplo, no caso dos pneumococos resistentes à penicilina e na resistência do *S. aureus* à meticilina (*mecA*); ou ainda como modificações da girase bacteriana levando ao surgimento de resistência às quinolonas.
- cii) Alteração no metabolismo bacteriano como no surgimento de resistência às sulfas, como nas cepas deficientes em timidina em relação ao trimetoprim. (AGUIAR, 2008 p. 94-95)

A multirresistência tem sido um grande problema enfrentado no meio hospitalar, em especial nas unidades de tratamento intensivo (UTI) e isso ocorre devido à menor higienização das mãos por parte dos profissionais do setor em função do excesso de trabalho, o que os torna veículos para os microorganismos de um paciente a outro e ao uso excessivo de antimicrobianos. Um exemplo é a *Staphylococcus aureus* MRSA que apresenta resistência a meticilina, oxacilina,

cefalosporinas, imipenem e aos aminoglicosídeos. Esta bactéria causa infecções em corrente sanguínea e também está frequentemente associada a pneumonias devido à utilização de ventilação mecânica. Entretanto, o maior problema está relacionado aos bacilos Gram-negativos que tem apresentado resistência a antimicrobianos de última geração. A fonte de transmissão desses microorganismos pode ser o contato direto ou indireto, sendo o direto pelas mãos dos profissionais de saúde e o indireto por utensílios contaminados (GOMES, et al., 2007). Assim, é preciso salientar que tanto a *Tatumella ptyseos* quanto a *Pseudomonas luteola* são bacilos gram-negativos e que os relatos clínicos mencionados anteriormente indicam que estas espécies podem levar os pacientes a septicemia em ambiente hospitalar. Assim podemos considerá-las bactérias nosocomiais patógenas.

6. Considerações finais

As bactérias encontradas pertencem a microbiota residente e a transitória. Isso pode ser comprovado pelos procedimentos de observação macroscópica das colônias formadas, pela coloração de Gram realizada, pela prova da catalase e identificação da espécie no sistema Walk Away®.

Foram detectadas uma grande quantidade de bactérias Gram-positivas, provavelmente do gênero *Staphylococcus* nas placas 1, 3, 5, 6 e 7 que são das maçanetas dos banheiros de professores, maçaneta interna do banheiro dos alunos (masculino), bebedouro dos professores (torneira natural e gelada) e da maçaneta do banheiro de alunos feminino respectivamente. Bactérias desse gênero são Gram-positivas pertencentes à microbiota residente, ou seja, não são eliminadas apenas com água e sabão e desde que não entrem em contato com a corrente sanguínea, boa parte das espécies não são maléficas aos seres humanos, pois muitas pertencem a microbiota normal. Problemas com bactérias do gênero *Staphylococcus* ocorrerão se as mesmas entrarem na corrente sanguínea por meio de algum acidente que eventualmente possa ocorrer no ambiente escolar.

Já a bactéria encontrada na placa da maçaneta interna do banheiro dos professores: *Pseudomonas luteola*, foi detectada em apenas uma colônia, e se trata de uma espécie saprófita ou comensal dificilmente patogênica aos seres humanos, pertencente à microbiota transitória. Dos poucos casos registrados há casos de septicemia causados pela bactéria estudada, o que representa risco uma vez que a espécie apresenta resistência a quatro antimicrobianos potentes, dificultando sua eliminação.

Na maçaneta do banheiro de alunos feminino e na torneira 1 do bebedouro dos alunos foi encontrada a mesma espécie: *Tatumella ptyseos*. Mediante diferenças no perfil de sensibilidade ficou comprovado que a espécie sofreu algum tipo de mutação, ou seja, não é a mesma. A maior quantidade de colônias formadas foi da placa do bebedouro e isso se deve ao fato de haver apenas um para atender a escola inteira. Essa espécie bacteriana é encontrada em resíduos de expectoração e pode provocar infecções traqueobrônquicas/pulmonar, infecções com associação a tuberculose pulmonar e também infecção gastrointestinal, sendo relatados dois casos de septicemia no Brasil. Pertence a microbiota transitória.

Sendo as duas espécies Gram-negativas pertencentes à microbiota transitória, sua eliminação seria feita de maneira eficaz apenas com a lavagem das mãos. O grande problema é que na escola em que foi feito o estudo, não há nenhum tipo de sabão ou sabonete nos banheiro e nem no lavatório externo que fica ao lado do bebedouro.

Assim, os estudantes ficam vulneráveis não apenas a contaminação por bactérias como também por vírus e por outros microorganismos como fungos e protozoários. Esses podem resistir por instantes fora do corpo humano ou mesmo por horas e até por um período maior que um dia, o que seria eliminado se fosse feita uma correta higiene dos ambientes como as maçanetas, as torneiras dos bebedouros com a utilização de detergentes, alcoóis e antissépticos, assim como com a correta higiene das mãos após o uso dos banheiros e antes do uso do bebedouro.

Medidas legais devem ser adotadas e aplicadas para que a escola e os demais ambientes públicos ofereçam o mínimo necessário para que o público possa se higienizar antes e após o uso do banheiro, bem como uma mudança do tipo de bebedouro, com torneiras em que não haja contato direto da boca com a água e sim com um objeto que a pessoa levará a boca posteriormente. É inaceitável que um ambiente onde a preocupação primeira é a educação não atenda a uma das formas de educação que é a higiene.

7. Referências Bibliográficas

AGUIAR, E., **Introdução à microbiologia clínica**. Casa do Novo Autor Editora: São Paulo, 2008 p. 39-41, 45-54, 93

ALCAMO, I. E.; ELSON, L.M., **Microbiologia: um livro para colorir**. São Paulo: Roca, 2004 p. 14

ARAÚJO, M.; **Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas**. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/microbiologia/bacterias-gram-positivas-e-gram-negativas/>> Acessado em 09 de junho de 2012.

BURTON, G. R.W.; ENGELKIRK, P.G.; **Microbiologia para Ciências da Saúde**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005 p. 6-8, 70- 75, 353

BUERIS, V.; MOREIRA, C. G.; SANTOS, K. R. N.; TEIXEIRA, L. M.; TRABULSI, L. R. *Staphylococcus epidermidis* e Outras Espécies de *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Rothia* (*Stomatococcus*) In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, Flavio (Orgs). **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 186

COSTA, P. S. G; MENDES, J. M. de C.; RIBEIRO, G.M. *Tatumella ptyseos* Causing Severe Human Infection: Report of the First Two Brazilian Cases. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Juiz de Fora, v. 12, n. 5, p. 442-443, 2008

CRUZ, W. B. **Bactérias e Arqueas**. Disponível em: http://moodle.cead.unb.br/disciplinas/file.php/187/biblioteca/modulos/modulo_7/Bloco_01_Unidade_06_EB_Bacterias.pdf Acessado em 02 de julho de 2011

DOUBLET, B.; ROBIN, F; CASIN, I; FABRE, L; FLECHE, A. L.; BONNET, R; WEILL, F-X. Molecular and Biochemical Characterization of the Natural Chromosome-Encoded Class A β -Lactamase from *Pseudomonas luteola*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 1, p. 45, 2010

GOMES, S. M. T.; VEROITI, M.; LIMA, C. P.; PARENTI, C. F.; SANTANA, H. T.; SOUSA, F. C. de; FLOSI, F. C.; MIRANDA, M. M. de; JESUS, M. M. de. **Investigação e controle de bactérias multirresistentes**. Brasília: Anvisa, 2007 p. 6, 10-13 Disponível: http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/reniss/manual%20controle_bacterias.pdf Acessado em: 19 de julho de 2012

HARWEY, R. A. CHAMPE; P. C. FISHER, B. D. **Microbiologia Ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008 p. 25, 49-51

HOLLIS, D. G.; HICKMAN, F. W.; FANNING, G. R.; FARMER III, J.J.; WEAVER, R. E.; BRENNER, DON J. *Tatumella ptyseos* gen. nov., sp. nov., a Member of the Family Enterobacteriaceae Found in Clinical Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 14, n. 1, 1981

LEVY, C. E.. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Brasília: Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. MIV p. 6-21; 43 Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf Acessado em: 12 de janeiro de 2012

LIMA, C. P.; PARENTI, C. F.; SOUSA, F. C.; FLOSI, F. C.; SANTANA, H. T.; MIRANDA, M. M.; VEROITI, M.; GOMES, S. M. **Higienização das mãos em serviços de saúde**. Brasília: Anvisa, 2007. p. 11-15 Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/higienizacao_maos/manual_integra.pdf Acessado em 12 de julho de 2012

LUZ NETO, L. S.; VOLPI, R.; BELTRÃO, E. R.; REIS, P. A.; **Microbiologia e Parasitologia: uma contribuição para a formação de profissionais da saúde**. 2. ed. Goiânia: AB, 2008 p. 8-9, 17

MIMICA, L. M. J.; MENDES, C. M. F.; MIMICA, I. M. Controle Laboratorial do Tratamento das Infecções Bacterianas. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Orgs). **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 96

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A.; **Microbiologia Médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004 p. 1, 7-9, 14-17

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R.; **Microbiologia prática: roteiro e manual: bactérias e fungos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005 p. 69-70

TRABULSI, L. R.; ORDOÑEZ, J. G.; MARTINEZ, M. B. *Enterobacteriaceae* In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F(Orgs.); **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 269-271

TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M.; BUERIS, V. ;*Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, Flavio (Orgs). **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 181

VALLS, A.; **CME – Antibiograma**. Disponível em: <
<http://webmail.diagnosticosdaamerica.com.br/ISO9000/DELBONI/ConhecMedico.nsf/All/CB459174A7D41EF903256C41004BC732?OpenDocument>> Acessado em 20 de agosto de 2012.